

Über die Pathogenese der lymphocytären Choriomeningitis
der Mäuse unter besonderer Berücksichtigung
des weißen Blutbildes

Eberhard Schüle

1973

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr.h.c. A. MAYR

und dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Kommissarischer Vorstand: Professor Dr. E. DAHME

UBER DIE PATHOGENESE DER LYMPHOCYTÄREN CHORIOMENINGITIS
DER MÄUSE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES WEISSEN
BLUTBILDES

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Eberhard Schüle
aus
Heilbronn

München 1973



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Dahme

Tag der Promotion: 23.II.1973

DEM ANDENKEN MEINES VATERS
UND MEINER LIEBEN MUTTER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. SCHRIFTTUM	2
A. Pathogenese der LCM	2
B. Weißes Blutbild bei der LCM	5
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	8
A. Material und Methoden	8
1. Virus	8
2. Mäuse	8
3. Infektionsmethoden	8
4. Leukocytenzählung	9
5. Untersuchung auf Krankheitserscheinungen	9
6. Pathologisch-anatomische Untersuchung	10
7. Infektiositätsteste	10
8. Komplementbindungsteste	11
B. Versuche und Ergebnisse	13
1. Veränderungen des weißen Blutbildes	13
a. bei neonatal infizierten, immuntoleranten Mäusen	14
b. bei der akuten Infektion nicht toleranter Mäuse	14
2. Krankheitserscheinungen	17
3. Pathologisch anatomische Veränderungen	18
4. Infektiosität des Blutes und gewisser Organe	18
5. Nachweis von KB-Antigen in Organen	19
6. Nachweis von KB-Antikörpern im Serum	20
7. Spontane Komplementbindung (Komplementverbrauch) durch Milzextrakte	20
IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	31
V. ZUSAMMENFASSUNG	35
VI. LITERATURVERZEICHNIS	39
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

Die lymphocytäre Choriomeningitis (LCM) ist eine Viruskrankheit, die in der Natur bei Mäusen und Hamstern vorkommt und durch die Exkrete dieser Tierarten auf den Menschen übertragen werden kann. Der Erreger gehört als Prototyp zur Klasse der Arenoviren, die in Europa, Amerika und Afrika nachgewiesen worden sind. Alle bis jetzt erforschten Vertreter dieser Klasse zeigen bei Nagetieren, die das natürliche Virusreservoir darstellen, eine auffallende Tendenz zu persistierender Infektion. Dieser Umstand, im Verein mit dem Vorkommen von Dauerinfektionen bei anderen tierischen und menschlichen Viruskrankheiten, so z.B. bei der infektiösen Anämie der Pferde, der afrikanischen Schweinepest und bei der menschlichen Serumhepatitis, haben in den letzten Jahrzehnten das Interesse zahlreicher Virusforscher auf die murine LCM gelenkt.

Im Gegensatz zu anderen, volkswirtschaftlich bzw. volksgesundheitlich wichtigeren Virusarten, ist das LCM-Virus im natürlichen Wirt, der Maus, leicht zu handhaben. Erkenntnisse, die an diesem Virus - Wirt - System gewonnen werden, sind zu gegebener Zeit vielleicht bei anderen Systemen anwendbar.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag liefern zur Pathogenese der LCM - Infektion der Maus, insbesondere der hierbei auftretenden hämatologischen Veränderungen.

II. S C H R I F T T U M

A. PATHOGENESE DER LCM

Die lymphocytäre Choriomeningitis der Mäuse wird mehr und mehr als Modell zur Erforschung von Phänomenen benutzt, die für die Medizin von großer Bedeutung sind. Es handelt sich unter anderem um die im Mutterleib erfolgende persistierende Virusinfektion (30, 34), die auch bei der murinen lymphatischen Leukämie eine wichtige Rolle spielt (5), die Immuntoleranz (3) und die virusbedingte Autoimmunkrankheit (10). Wesentliche Erkenntnisse wurden bei der LCM-infizierten Maus auch hinsichtlich des Mechanismus der antiviralen Immunität gewonnen (37).

Die Dauer der LCM-Infektion und ihr Krankheitsbild sind weitgehend vom Alter der Tiere zur Zeit der Infektion abhängig (33). Erfolgt diese im Embryonalstadium, so bleibt sie das ganze Leben hindurch bestehen; dabei lassen die Mäuse in der Regel keinerlei Krankheitserscheinungen erkennen. Sie zeigen zeitlebens eine Immunität gegenüber experimenteller Superinfektion mit LCM-Virus, ohne daß sie spezifische Antikörper bilden. Diese Vorgänge sind Ausdruck und Folge der bei solchen Tieren bestehenden, virusspezifischen Immuntoleranz (3).

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei neonatal infizierten Mäusen (9), doch ist bei diesen die Toleranz im allgemeinen von etwas kürzerer Dauer als nach kongenitaler Infektion (33), die bei der Wildmaus, dem natürlichen Virusreservoir des LCM-Virus, der hauptsächlichste Infektionsmodus zu sein scheint.

Grundlegend anders verhalten sich Mäuse, die als erwachsene Tiere experimentell infiziert werden (2, 33, 15). Im Gegensatz zu kongenital oder neonatal infizierten Mäusen zeigen sie Krankheitserscheinungen, die je nach dem Infektionsmodus und dem Organotropismus des zur Infektion benutzten Virusstammes verschieden sind (33). Besonders charakteristisch sind der nach intracerebraler (ic) Infektion zu beobachtende starke Tremor und die typischen, meist tödlich endenden Streckkrämpfe. Diese können leicht dadurch ausgelöst werden, daß man die Tiere am Schwanz hochhält, um die Längsachse rotiert und sie dann in den Käfig zurückfallen läßt.

Nach Virusinjektion in eine Planta (ipl) kommt es zu einer deutlich ausgeprägten Schwellung der betreffenden Pfote (11).

Nach intraperitonealer (ip) Infektion entsteht mehr oder weniger häufig eine seröse Peritonitis und Pleuritis (32), die oft mit Leberdegeneration einhergeht.

In jedem Fall beträgt die Inkubationsfrist mindestens 5 Tage. Sie kann sich je nach der injizierten Virusmenge bis auf 12 Tage verlängern.

Das histologische Bild wird beherrscht durch eine mehr oder weniger massive Lymphocyteninfiltration der Organe (21), die auf dem Höhepunkt der Erkrankung bis wenige Tage danach am stärksten ausgeprägt ist und dann an Intensität rasch abnimmt. Geringgradige Infiltrate können jedoch für längere Zeit bestehen bleiben (31).

Typische Krankheitsbilder können nur bei Mäusen erzeugt werden, die zur Zeit der Infektion mindestens 2 Wochen alt sind (15). In diesem Lebensalter ist, im Gegensatz zu kongenital

bzw. neonatal infizierten Mäusen, der immunologische Apparat bereits funktionstüchtig, sie können Antikörper bilden und es kommt hier nicht zu Immuntoleranz.

Am leichtesten und schon frühzeitig nachweisbar sind komplementbindende (KB) und fluoreszierende Antikörper, die jedoch beide mit der aktiven Immunität der Tiere nichts zu tun haben (13, 5, 58). Hingegen gelingt der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern mit Sicherheit erst mehrere Monate nach erfolgter Infektion (17). Auch diese Antikörperart scheint nach neueren Erkenntnissen bei der aktiven Immunität eine untergeordnete Rolle zu spielen und an der Viruseliminierung in viel geringerem Maße beteiligt zu sein als sensibilisierte Lymphocyten (40).

Bei kongenital infizierten, toleranten Mäusen fehlt ein solcher Mechanismus. Sie sind unfähig, das in hoher Konzentration im Körper befindliche Virus zu beseitigen (34).

Daß die Krankheitssymptome bei experimentell infizierten erwachsenen Mäusen nicht auf einer direkten Organschädigung durch das LCM-Virus beruhen, wurde erstmals in Versuchen erwiesen, in denen sowohl Krankheitserscheinungen als auch histologische Organveränderungen bei Mäusen verhindert werden konnten, wenn sie vor der Infektion einer Röntgenbestrahlung unterworfen worden waren (26). Die Virusvermehrung wurde durch die Bestrahlung nicht gehemmt. Im Gegenteil, bestrahlte Mäuse blieben für längere Zeit Virusträger als nicht bestrahlte infizierte Kontrollen. Von Röntgenstrahlen ist bekannt, daß sie die Lymphocytenzahl drastisch zu senken vermögen. Ähnliche Befunde wurden in der Folgezeit nach Behandlung mit chemischen immunsuppressiven Substanzen (6, 13, S.44), Anti-Lymphocytenserum (22), Anti-Thymocytenserum (8) oder nach neonataler Thymektomie (27, 29) erhoben. Auf Grund dieser Beobachtungen und der Tatsache, daß immuntolerante

Mäuse trotz des sehr hohen Virusgehaltes des Blutes und der Organe äußerlich gesund erscheinen, wurde die Theorie aufgestellt (10), daß die Krankheitserscheinungen bei LCM-infizierten nicht toleranten Mäusen auf einem der Abwehrreaktion gegen fremdes Gewebe vergleichbaren immunologischen Konflikt beruhen. Diese Abwehrreaktion ist in der Hauptsache, wenn nicht ausschließlich, auf die Aktivität von sensibilisierten, sog. "Killer"-Lymphocyten zurückzuführen (13, S.24). Es gibt gute Anhaltspunkte dafür, daß bei der murinen LCM die krankmachende zelluläre Abwehrreaktion gegen ein neues Antigen gerichtet ist, das an der Oberfläche infizierter Zellen entsteht (1). Dieses Antigen ist bislang jedoch noch nicht isoliert und näher charakterisiert worden.

Nicht nur die akute, bei experimentell infizierten erwachsenen, nicht toleranten Mäusen auftretenden Krankheitserscheinungen werden heute auf eine zelluläre Autoimmunreaktion zurückgeführt, sondern auch das bei neonatal infizierten, anfänglich toleranten Mäusen zu beobachtende frühzeitige Altern (12). Man nimmt an, daß nach dem Abklingen der Immuntoleranz die zellulären und humoralen Abwehrkräfte des Organismus wirksam werden und die Erkrankung des Tieres bedingen. Histologisch findet man bei solchen Mäusen häufig eine Glomerulonephritis. Diese Befunde reihen die murine LCM in die ätiologisch heterogene Gruppe der langsamen Viruserkrankungen ("slow virus diseases") ein.

B. WEISSES BLUTBILD BEI DER LCM

Über das weiße Blutbild bei LCM-infizierten Mäusen finden sich in der Fachliteratur nur spärliche Angaben.

TRAUB (33) fand bei intravenös infizierten Mäusen auf dem Höhepunkt der akuten Erkrankung eine starke Leukocytose. Bei ic infizierten Mäusen beobachteten HOTCHIN und WEIGAND (16) während der ersten 3 Tage p.i. eine Leukopenie, gefolgt von einer Leukocytose mit einer Spitze am 7. Tag. In einer späteren Arbeit erwähnte TRAUB (37) kurz, daß ip infizierte Mäuse im Frühstadium ebenfalls einen Lymphocytenabfall auf etwa ein Drittel des Normalwertes und danach, beginnend am 8. Tag p.i., eine starke Lymphocytose aufwiesen.

Von Bedeutung sind hier auch Befunde, besonders diejenigen von HANAOKA et al. (7), die histologische Veränderungen in Thymus, Milz und Lymphknoten in Beziehung zur Virusvermehrung setzten. Letztere war vergesellschaftet mit einem markanten Schwund der thymus-abhängigen Lymphocyten ("T-Zellen") in Milz und Lymphknoten, der schon am 2. Tag p.i. einsetzte und am 3. Tag deutlich ausgeprägt war. Im Thymus wurde 3 bis 5 Tage später ein Schwund der kortikalen Lymphocyten beobachtet, der mit einer signifikanten Gewichtsabnahme dieses Organs einherging. Nach LEHMANN - GRUBE (20, S.73) ist jedoch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß diese Veränderungen in lymphoretikulären Organen nicht auf einer direkten Wirkung des Virus auf die Lymphocyten beruhen, sondern indirekt durch Freisetzung von Nebennierenrindenhormonen im Laufe der LCM-Infektion verursacht werden.

Bezüglich der bei LCM-infizierten Mäusen erobenen virologischen, serologischen und pathologisch-anatomischen Befunde, die je nach dem zur Infektion dienenden Virusstamm stark variieren können, wird auf 2 kürzlich erschienene Monographien (13, 20) verwiesen. Angaben, die einen direkten Bezug zu vorliegender Thematik haben, finden sich jedoch auch hier nicht.

Auf spontane Komplementbindung durch Milzextrakte von Mäusen, die auf dem Höhepunkt der Erkrankung getötet wurden, haben TRAUB und KESTING (38) hingewiesen. Dieses zunächst als "antikomplementärer" Effekt bezeichnete Phänomen beruht offenbar darauf, daß Antigen und spezifische Antikörper gleichzeitig in der Milz vorhanden sind und bei Zusatz von Komplement dieses binden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Neben dem Studium der Veränderungen des weißen Blutbildes bei LCM-infizierten Mäusen ist es Ziel dieser Arbeit, die hämatologischen Befunde in Beziehung zu setzen zu den Krankheiterscheinungen, den makroskopischen Organveränderungen, zur Virusvermehrung, zur Bildung von KB-Antigen und KB-Antikörpern, sowie zur spontanen Komplementbindung durch Milzextrakte, gemessen an deren Komplementverbrauch.

A. MATERIAL und METHODEN

1. Virus. Benutzt wurde hauptsächlich der in den U.S.A. isolierte Virusstamm WCC (35) nach 372 bis 374 ic Mäusepassagen. Dieses Virus unterscheidet sich u.a. dadurch von einem frisch von der Wildmaus isolierten Stamm, daß es bei ip infizierten erwachsenen Mäusen weniger pathogen ist und die Leber weniger stark angreift. Seine Fähigkeit, bei erwachsenen Mäusen persistierende Infektion zu erzeugen, ist etwas geringer als bei einem nicht modifizierten Naturvirus. Bei ic Infektion ist es stark pathogen für Mäuse aller Altersstufen.

2. Mäuse. In allen Versuchen wurden weibliche Jungmäuse des nicht ingezüchteten NMRI-Stammes verwendet, die von der Firma Ivanovas, Kisslegg i. Allgäu geliefert wurden. Ihr Alter bei Versuchsbeginn ist jeweils im Text angegeben.

3. Infektionsmethoden. Die Materialspender für die in den Abbildungen 1-6 bzw. in Tabelle 2 verzeichneten Versuche erhielten jeweils 0,2 ml eines 10%igen Extraktes von infektiösem Mäusegehirn der 372. bis 374. ic Mäusepassage des Stam-

mes WCC ip und 0,05 ml desselben Extraktes subkutan in die rechte Planta. Die Infektiositätstiter der benutzten Gehirnextrakte schwankten bei ic Titration in Mäusen zwischen $10^{5,7}$ und $10^{6,7}$ ID₅₀/ml.

Die in Tabelle 1 verzeichneten immuntoleranten Tiere waren mit dem Virusstamm W (36) neonatal, d.h. im Alter von weniger als 24 Stunden nach der Geburt ic infiziert worden. Durch ic Überimpfung von Herzblut auf nicht infizierte Testmäuse wurde nachgewiesen, daß sie Virusträger waren. In gleicher Weise behandelte Wurfgeschwister bildeten keine oder, in seltenen Fällen, höchstens Spuren von KB-Antikörpern. Es kann also angenommen werden, daß auch bei den hämatologisch untersuchten Tieren Immuntoleranz bestand.

4. Leukocytenzählung. Die Blutentnahme für die Leukocytenzählung erfolgte bei den in den Abb. 1 und 2 sowie in den Tabellen 1 und 2 registrierten, mit Äther narkotisierten Mäusen durch Punktion einer Schwanzvene nach Erwärmung des Schwanzes im Wasserbad bei 45 bis 50°C. In den übrigen Versuchen wurde Herzblut von jeweils 8 Mäusen einer Gruppe zu gleichen Teilen gemischt. Die Blutgerinnung wurde durch Heparinzusatz verhindert (0,45 ml Blut + 0,05 ml Heparinlösung (= 20 IE) je Maus) und dieser bei der Berechnung des Leukocytenzahlen einkalkuliert. Zur Zählung dienten Kammern nach Neubauer. Blutausstriche wurden nach der Methode von Pappenheim gefärbt. In jedem Ausstrich wurden 200 Zellen ausgezählt und aus den Prozentsätzen der verschiedenen Leukocytenarten sowie der Gesamt-leukocytenzahl pro mm³ die absoluten Zahlen der einzelnen Zelltypen errechnet.

5. Untersuchung auf Krankheitserscheinungen. Die frühestens am 5. Tag p.i. einsetzende Schwellung der injizierten Hinterpfote und eventuell auftretende Allgemeinerscheinungen wurden für jede Maus laufend registriert. Als Maßstab für das

Wachstum der Tiere diente das Körpergewicht. Infizierte Mäuse wurden zu den unten angegebenen Zeiten einzeln bzw. in Gruppen gewogen. Gleichzeitig wurde das Gewicht von genau gleichaltrigen normalen Tieren ermittelt und mit dem der infizierten Mäuse verglichen.

6. Pathologisch-anatomische Untersuchung. Nach Tötung wurde jede Maus auf Organveränderungen untersucht. Zur Bestimmung der mittleren Organgewichte bei Mäusen der infizierten und Kontrollgruppen diente eine Präzisionswaage. Die Organgewichte wurden jeweils in Prozenten des Körpergewichts ausgedrückt, um die physiologische Gewichtszunahme mit steigendem Alter zu berücksichtigen.

7. Infektionsteste. Vom heparinisierten Herzblutgemisch einer Mäusegruppe erhielten 3 Testmäuse je 0,03 ml ic. Der Rest des Blutes wurde zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und für serologische Untersuchungen eingefroren. Zwecks Eliminierung von nicht zellgebundenem Virus und von Antikörpern wurde der Zellrückstand in je 9 ml steriler phosphatgepufferter NaCl-Lösung (0,3 g KH_2PO_4 ; 2,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 6,45 g NaCl; 0,17 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,033 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; dest. Wasser ad 1000 ml) 3 mal gewaschen, die Waschwässer verworfen und nach der 3. Waschung das Zellsediment mit der nachstehend beschriebenen isotonischen Salzlösung auf das ursprüngliche Blutvolumen ergänzt. Daraus wurden wiederum je 0,05 ml auf je 3 Testmäuse ic verimpft.

Die zu prüfenden Organe einer Mäusegruppe von je 8 Tieren wurden mit sterilem Seesand der Firma L. Merck, Darmstadt und einer isotonischen Salzlösung (8,0 g NaCl; 0,3 g KCl; 0,24 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 2,0 g NaHCO_3 ; 1,8 g Glucose; 0,01 g wasserlösliches Phenolrot; dest. Wasser ad 1000 ml) zu 20%igen Suspensionen angerieben. Nach dem Zentrifugieren (2500 U.p.M., 15 Minuten) wurden die Überstände unverdünnt in Dosen von 0,03 ml 3 (ausnahmsweise 2) ca. 4 Wochen alten

Jungmäusen in Äthernarkose ic injiziert. Bei Virustitrationen wurden die 20%igen Extrakte in Potenzen von 10 in derselben Salzlösung unter Verwendung einer frischen Pipette pro Verdünnung fortlaufend verdünnt. Die im Eisbad gehaltenen Verdünnungen wurden je 4 narkotisierten Mäusen ic injiziert.

Nicht erkrankte Testmäuse wurden 3 Wochen später durch ic Infektion von je 0,03 ml Mäusegehirnextrakt, 10^{-1} verdünnt, auf Immunität geprüft. Die durch die Erstinfektion immunisierten Tiere wurden bei der Berechnung der ID_{50} nach REED und MUENCH (24) als infiziert gewertet.

8. Komplementbindungsteste. Da die Kältebindungsmethode sich in Vorversuchen als wesentlich empfindlicher erwiesen hatte als das weniger zeitraubende Wärmebindungsverfahren, wurde ausschließlich erstere Methode angewandt. Als Reagenzien dienten:

- a.) Konserviertes Komplement (C') der Behringwerke A.G. Marburg/Lahn, ausnahmsweise C' eigener Produktion, das mit Witte-Flüssigkeit konserviert war (Lösung von 2 g Borsäure und 5 g Kaliumsulfat in 50 ml Aqua dest., zu gleichen Teilen gemischt mit normalem Meerschweinchenserum als C'-Quelle);
- b.) Hämolytischer (Kaninchen-) Ambozeptor der Behringwerke;
- c.) in Alsever-Lösung konservierte, 3 mal gewaschene Hammelblutkörperchen;
- d.) 20%ige Organextrakte (s. oben) zum Nachweis von KB-Antigen. Vor Gebrauch wurden die Extrakte mehrere Tage bei -20°C gefroren und nach dem Auftauen nochmals scharf zentrifugiert;
- e.) Als Verdünnungsmittel für die Reagenzien wurde die oben beschriebene phosphatgepufferte NaCl-Lösung benutzt. Das hämolytische System (HS) enthielt 2% gewaschene Hammelblutkörperchen und Ambozeptor in 3-fach stärkerer Konzentration als die von der Firma angegebene Endverdünnung.

Die in Röhrchen angesetzten Gemische enthielten 0,1 ml Serum-, Antigen-, und C'-Verdünnung plus 0,2 ml HS. Die C'-Titration erfolgte in jedem Versuch in Gegenwart von Antigen bzw. Testserum, wobei die Gemische vor Zusatz des HS 21 Stunden bei + 3°C gehalten wurden.

Im Hauptversuch wurde das C' in geringerem Überschuß (1,1 bis 1,2 Einheiten) verwendet. In jedem Versuch liefen Kontrollen mit, in denen die verschiedenen Reagenzien mit Ausnahme des HS durch gepufferte NaCl-Lösung ersetzt wurden. Vor Zusatz des HS wurden die Reaktionsgemische zur Bindung 21 Stunden im Kühlschrank bei + 3°C und danach zur Lyse 30 Minuten im Wasserbad bei + 37°C gehalten. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte vor und nach Sedimentierung der Zellen, wobei der Prozentsatz der nicht gelösten Erythrocyten visuell geschätzt wurde. (4 + = keine Hämolyse, deutlich erkennbar nach Sedimentierung der Zellen; 3,5 bis 0,5 + = unterschiedliche Hämolysestufen, - = vollständige Hämolyse). Bei Serumtitrationen wurden Mäusesera in Verdünnungen von 1:5, 1:10, 1:20 usf. geprüft, die Antigene bei Antigentitrationen unverdünnt, 1:2, 1:4 usf. bis über den mutmaßlichen Reaktionsendpunkt hinaus.

Die ungefähr 50% Hämolyse (2+ Reaktion) erlaubende Serum- bzw. Antigenverdünnung wurde graphisch ermittelt (32).

Spontane Komplementbindung durch Milzextrakte. Diese war bei der C'-Titration in der Kälte zu erkennen. Auch hier wurde diejenige C'-Verdünnung graphisch bestimmt, die etwa 50%ige Hämolyse erzeugt haben würde.

Weitere technische Angaben finden sich bei der Beschreibung der einzelnen Versuche im Text.

B. VERSUCHE und ERGEBNISSE

1. Veränderungen des weißen Blutbildes. Das weiße Blutbild wurde sowohl bei immuntoleranten Virusträgern als auch bei nicht toleranten infizierten Mäusen untersucht.

In einem Vorversuch wurde in Bestätigung der in der Literatur angegebenen Befunde festgestellt, daß die Leukocytenzahlen bei nicht mit LCM-infizierten, völlig gesund erscheinenden Mäusen stark variieren. So schwankte bei 22 im Alter von 5 Wochen hämatologisch untersuchten Weibchen die Leukocytenzahl zwischen 4.400 und 18.350 Zellen pro mm^3 . Der Mittelwert bei dieser Gruppe betrug 7.965 Leukocyten. Auch bei wiederholter Blutentnahme aus Schwanzvenen bei ein und demselben Tier war die Schwankungsbreite beträchtlich.

Um die individuellen Schwankungen einigermaßen auszugleichen, wurden jeweils Mäusegruppen von meistens 8 Tieren je Gruppe in den Versuch genommen. Bei wiederholter Entnahme von Schwanzvenenblut (Versuche in Abb. 1 und 2) wurden die Zellzahlen bei Einzelmäusen ermittelt und aus den Befunden die Gruppen-Mittelwerte errechnet.

Beim Studium des Differentialblutbildes ergaben sich ähnlich wie bei der infektiösen Mononukleose des Menschen (23) erhebliche Schwierigkeiten bei der Unterscheidung der großen Lymphocyten von den Lymphoblasten und den Monocyten. Eigene Erfahrungen stimmen hierin nicht mit denen von SCHERMER (28, S.68) überein, der diese Zellarten bei normalen Mäusen ohne besondere Schwierigkeiten differenzieren konnte. Weniger problematisch war die Unterscheidung reifer Granulocyten von deren Jugendformen und von den Lymphoblasten. Basophile Leukocyten wurden bei keinem Tier gefunden. Ebenso fehlten die Eosinophilen bei vielen Mäusen ganz oder aber sie waren nur in

geringer Zahl vorhanden.

Wegen der Unsicherheit in der Klassifizierung der verschiedenen Arten mononukleärer Zellen wurden in den Tabellen 1 und 2 sowie in Abb. 6 die Lymphoblasten und Monocyten (im letzteren Fall unter dem Sammelbegriff "Lymphoidzellen") zusammengefaßt, da sie alle dem lymphoretikulären Zellsystem entstammen.

a. Weißes Blutbild bei neonatal ic infizierten immuntoleranten Mäusen. Die bei zwanzig 7 Wochen alten Mäusen dieser Art und bei gleichaltrigen, nicht infizierten Kontrollen ermittelten Leukocytenzahlen sind in der Tabelle 1 wiedergegeben. Sie zeigt, daß zwischen den beiden Mäusegruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden.

b. Das weiße Blutbild nach kombinierter intraperitonealer und intraplantarer Infektion bei 3-5 Wochen alten, nicht toleranten Mäusen. Mit solchen Tieren wurden 5 Versuche ausgeführt. Die Versuche 1 und 2 (Abb. 1 und 2) sollten die Veränderung des Blutbildes bei täglicher Blutentnahme (28, S.65) aus den Schwanzvenen zeigen. Zur Kontrolle des unspezifischen Leukocytenanstiegs durch wiederholte Blutentnahme wurde jeweils die gleiche Anzahl nicht infizierter, gleichaltriger Kontrolltiere hämatologisch untersucht. Beide Gruppen bestanden jeweils aus 8 Tieren.

Im Versuch 3 (Abb. 3 und 4) wurde das Blut durch Herzpunktion von Mäusegruppen mit je 8 Tieren gewonnen, heparinisiert und zu gleichen Teilen gemischt (s. "Material und Methoden").

Im 4. Versuch (Abb. 6) wurde das Blut nach derselben Methode wie in Versuch 3 gewonnen, dabei aber besonderer Wert auf die Zeiten gelegt, die zuvor die deutlichsten Abweichungen von der Norm hatten erkennen lassen.

Im 5. Versuch (Tabelle 2) erfolgte die Blutentnahme am 8. Tag p.i. aus einer Schwanzvene. Der Versuch sollte die Streubreite der Leukocytenzahlen im Stadium der Leukocytose (s. unten) und die der anderen untersuchten Parameter bei einer größeren Zahl von Einzelmäusen aufzeigen.

Die Ergebnisse des 1. Versuchs, bei dem von 3-4 Wochen alten Weibchen täglich bis zum 10. Tag und am 14. Tag p.i. Blut entnommen wurde, sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die errechneten Mittelwerte bei infizierten und normalen Mäusegruppen lassen erkennen, daß bei den ersteren bereits am 2. Tag ein starker Leukocytenabfall einsetzte, der ausschließlich die lymphoiden Zellen betraf. Die absolute Zahl dieser Zellen pro mm^3 Blut sank von etwa 4.000 auf 1.300 ab, also auf etwa ein Drittel des kurz vor der Infektion ermittelten Ausgangswertes. Am 5. Tag p.i. setzte ein Anstieg dieser Zellen ein, der am 8. Tag mit etwa 9.000, gegenüber 6.000 bei den kontrollen, seinen Höhepunkt erreichte. Danach kam es zu einem allmählichen Abfall. Am 14. Tag war der Unterschied zwischen infizierten und Kontrollmäusen nur noch gering.

Während die Granulocyten am 2. und 3. Tag keine deutliche Abnahme erkennen ließen, war ihre Zahl, verglichen mit den Kontrollen, zwischen dem 4. und 9. Tag um durchschnittlich 1000 Zellen pro mm^3 erhöht, um danach zur Norm zurückzukehren.

Im 2. Versuch wurden 4-5 Wochen alte Weibchen bei gleicher Versuchstechnik untersucht. Die in Abb. 2 verzeichneten Versuchsergebnisse gleichen den in Versuch 1 erhobenen Befunden. Es kam wiederum zu einer sehr raschen Abnahme der Lymphoidzellen, diesmal vom 1. bis zum 4. Tag p.i. mit einem Tief am 4. Tag, und anschließend zu einer starken Lymphocytose mit einem Gipfel am 9. Tag. Auch die Granulocyten ließen wiederum einen Anstieg vom 4. bis zum 9. Tag p.i. erkennen.

Ähnliche hämatologische Ergebnisse lieferten die mit Herzblut von 3 Wochen alten weiblichen Mäusen ausgeführten Versuche 3 und 4. Wie die Abb. 3 zeigt, entfällt hier jedoch in den Abb. 1 und 2 bei den Kontrollen erkennbare durch wiederholte Blutentnahme bedingte unspezifische Zunahme der lymphoiden Zellen. Dagegen war hier bei normalen Mäusen eine Vermehrung dieser Zellen mit zunehmendem Alter erkennbar. Diese tritt in den Abb. 1 und 2 nicht in Erscheinung, da sie durch die auf wiederholter Blutentnahme aus dem Schwanz beruhende Zunahme der Leukocytenzahlen verdeckt wird. Erwähnt sei noch, daß die Leukocytenwerte bei Blutentnahme aus dem Schwanz bei infizierten und normalen Mäusen um 60 bis 80% höher lagen als bei Blutentnahme aus dem Herzen.

Versucht man unter Vorbehalt (s. S.14) die lymphoiden Zellen morphologisch zu differenzieren, so ist aus der Abb. 4 zu ersehen, daß an dem Anstieg dieser Zellen mit einem Gipfel am 8. Tag in hohem Maße Lymphoblasten beteiligt sind. Im Blutausstrich und auch in der Zählkammer waren diese Zellen viel größer als kleine Lymphocyten. Wie Monocyten, so zeigten auch sie sehr häufig einen stark eingebuchteten oder gelappten, zuweilen in verschiedene Teilstücke zerfallenden, wenig pyknotischen Kern, sowie ein graublaues, fein granuliert erscheinendes Protoplasma (28, S.68). In letzterem wurden jedoch nur selten Vakuolen festgestellt, die für Monocyten besonders charakteristisch sein sollen. Für die Identität dieser Zellen mit Lymphoblasten spricht auch der Umstand, daß sie sich offenbar sehr schnell in typische Lymphocyten umwandeln. Bereits am 10. Tag p.i. war ihre Zahl relativ sehr stark vermindert (s. Abb. 4). Der 5. Versuch (Tabelle 2) zeigte bei 18 am 8. Tag p.i. hämatologisch untersuchten Einzelmäusen eine signifikante Erhöhung der Leukocytenwerte und aller darin enthaltenen Zellfraktionen.

Parallel zu den Veränderungen des weißen Blutbildes wurden in den Versuchen 3 und 4 (Abb. 5 und 6) Parameter untersucht und in zeitlicher Abhängigkeit gegenüber gestellt, die im Verlauf der Infektion Veränderungen erwarten ließen. Es handelt sich neben dem Krankheitsbild am lebenden Tier um die pathologisch-anatomischen Veränderungen, die Infektivität des Blutes und bestimmter Organe, das Vorkommen von KB-Antikörpern im Blut sowie die spontane Komplementbindung durch Milzextrakte zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion.

2. Krankheitserscheinungen. Die in Tabelle 1 verzeichneten immuntoleranten Mäuse zeigten zur Zeit der Untersuchung, d.h. im Alter von 7 Wochen keine Krankheitserscheinungen. Sie waren von den gleichaltrigen Kontrollen äußerlich nicht zu unterscheiden. Wohl aber wurden bei nicht toleranten Tieren nach kombinierter ip und ipl Infektion gewisse Symptome festgestellt.

Da die Pathogenität des Virusstammes WCC bei extraneuraler Infektion relativ gering ist, lag in den Versuchen 1-5 die Sterblichkeitsziffer bei infizierten Mäusen, die länger als 6 Tage am Leben gelassen wurden, unter 5%. Pleuritiden und Peritonitiden, verbunden mit stark erschwelter, pumpender Atmung, die nach Infektion mit einem "viscerotropen" Stamm sehr häufig vorkommen, traten verhältnismäßig selten auf. Das hervorstechende Symptom war eine graduell unterschiedliche Schwellung der injizierten Hinterpfote, die nach dem 5. Tag bei allen Mäusen festgestellt wurde, am 8. Tag ihren Höhepunkt erreichte und bereits am 14. Tag abgeklungen war. (s. Abb. 5 und 6).

Eine laufende Bestimmung des mittleren Körpergewichts bei infizierten und normalen Mäusegruppen der versuche 3 und 4 ergab in Bestätigung der Befunde amerikanischer Autoren (14), daß die Infektion bei solchen Mäusen ihr weiteres Körperwachs-

tum hemmt. Eine deutliche Wuchshemmung wurde in den Versuchen 2 und 5 festgestellt. Der Gewichtsunterschied zwischen infizierten und normalen Tieren war bereits am 4. Tag p.i. erkennbar und am 9. Tag am markantesten (s. Abb. 5). Am 21. Tag hatten die infizierten Mäuse wieder das gleiche Gewicht wie die Kontrollgruppe. Daß auch hier individuelle Unterschiede bestehen können, ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

3. Pathologisch-anatomische Veränderungen. In den ersten 5 Tagen nach der Infektion waren in sämtlichen Versuchen keine makroskopisch erkennbaren Organveränderungen nachweisbar. Am 6. Tag wurde bei wenigen Tieren seröse Peritonitis und Pleuritis festgestellt. In dem in Abb. 5 verzeichneten 3. Versuch wurden am 6. Tag p.i. aus den restlichen infizierten Tieren 8 kranke Mäuse ausgesucht, die bei der Zerlegung Peritonitis, Pleuritis oder beides in verschiedenem Grade zeigten. Die Mehrzahl dieser Tiere ließ zudem eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Leberdegeneration erkennen. Am 8. Tag wurde in allen Versuchen eine unterschiedlich starke Lymphknoten- und Milzschwellung festgestellt (s. Abb. 5 und 6, Tabelle 2). In Abb. 5 sind die mittleren Milzgewichte (jeweils ausgedrückt in Prozenten des mittleren Körpergewichts) der infizierten Mäusegruppen graphisch dargestellt. Die Kurve läßt einen allmählichen Anstieg erkennen mit einem Höhepunkt am 8. und 9. Tag. Danach erfolgte eine allmähliche Rückkehr zur Norm, die zwischen dem 14. und 21. Tag erreicht wurde. Der Thymus und die Leber zeigten keine markanten Gewichtsveränderungen (s. Abb. 6).

4. Infektiosität des Blutes und gewisser Organe. Angaben über die Virusvermehrung finden sich in den Abb. 5 und 6. Wie der in Abb. 6 verzeichnete Titrationsversuch zeigt, reicherte sich das HCM-virus, Stamm WCO in der Milz sehr rasch an. Nach

den ersten 6 Stunden p.i. war noch kein Titeranstieg festzustellen, aber schon nach 24 Stunden hatte sich der virustiter um $3.1 \log 10$ erhöht.

Rückschlüsse auf die Höhe des Virusgehaltes bestimmter Organe ließen sich aus der Anzahl, und zusätzlich aus der Inkubationsfrist der erkrankten, mit organsuspension infizierten Testmäuse ziehen. Danach reicherte sich das Virus in lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz und Thymus) am stärksten an und persistierte in ihnen im allgemeinen auch am längsten (s. Abb. 5). Die Leber war nur vom 1. bis 8. Tag infektiös (s. Abb. 6) und im Gehirn waren bis zum 5. Tag nur Spuren von Virus nachzuweisen (s. Abb. 5). Vom 6. bis 14. Tag war dieses Organ nicht infektiös.

Im Blut wurde vom 1. bis zum 7. Tag regelmäßig Virus nachgewiesen. Von 28 Einzelmäusen, von denen 18 in Tabelle 2 verzeichnet sind, hatten am 8. Tag nur noch 16 Tiere eine Virämie. In der Mehrzahl der positiven Fälle enthielt das Blut nur Spuren von aktivem Virus. Dies ist daraus zu schließen, daß die injizierten Testmäuse sich oft nur zum Teil als infiziert erwiesen bzw. erst nach stark verlängerter Inkubationszeit erkrankten. Gewaschene Blutzellen und Gesamtblut lieferten dieselben Ergebnisse (s. Abb. 5).

5. Nachweis von AB-Antigen in Organen. Ergebnisse diesbezüglicher Tests sind in den Abb. 5 und 6 sowie in Tabelle 2 verzeichnet. In der Milz waren geringe Mengen dieses Antigens bereits 24 Stunden p.i. nachweisbar. Sein Titer stieg an den beiden folgenden Tagen auf Werte von 1:11 bis 1:16 und blieb bis zum 5. Tag nahezu unverändert. Danach erfolgte ein rascher Abfall. Ähnliche Ergebnisse lieferten Lymphknotenextrakte, während im Thymus die Antigenbildung langsamer ablief und die Titerwerte niedriger lagen als bei Milz und Lymph-

knoten. Im Gehirn wurden vom 5. bis zum 9. Tag nur sehr geringe Antigenmengen nachgewiesen und die Teste von Leberextrakten verliefen negativ. Am 8. Tag p.i. fanden sich höchstens noch Spuren von KB-Antigen in den geprüften Organen und am 10. Tag waren die Resultate durchwegs negativ. Im Ganzen lagen die bei WCC-infizierten Mäusen ermittelten Titerwerte weit unter denen, die man nach Infektion mit einem "viscerotropen" Virusstamm feststellen kann.

Wie die Tabelle 2 zeigt, gelang am 8. Tag p.i. der Antigen-nachweis in der Milz nur noch bei einer von 18 Einzelmäusen. Bei diesem Tier, das bei der Sektion eine hochgradige peritonitis aufwies, war auch das Blut noch relativ stark infektiös. Die beiden mit Heparinblut ic injizierten Testmäuse erkrankten nach verhältnismäßig kurzer Inkubationszeit.

6. Nachweis von KB-Antikörpern im Serum. In Serumgemischen von infizierten Mäusen waren geringe Mengen von KB-Antikörpern auch mit dem empfindlichen Kältebindungsverfahren frühestens am 8. Tag p.i. nachweisbar (s. Abb. 5 und 6). Von diesem Zeitpunkt an stieg der Titer fast linear bis zum Höchstwert von 1:51 am 21. Tag. Eine weitere Steigerung erfolgte nicht, was ein am 28. Tag p.i. ausgeführter zusätzlicher Test bei einer Gruppe von infizierten Ersatzmäusen zeigte.

von 18 am 8. Tag entnommenen Seren von Einzelmäusen reagierten 11 in der KBR negativ und 7 enthielten nur Spuren von Antikörpern (s. Tabelle 2).

7. Spontane Komplementbindung (Komplementverbrauch) durch Milzextrakte. Vorversuche hatten gezeigt, dass dieser Effekt nur bei der C'-Titration in Gegenwart von Milzantigen in der

Kälte nachweisbar ist, nicht dagegen bei C'-Auswertung nach der klassischen Methode (30 Minuten bei + 37°C im Wasserbad). Auch sind konzentrierte (20%ige), durch Zentrifugieren gut geklärte Extrakte für die Reaktion erforderlich.

In dem in Abb. 5 wiedergegebenen 3. Versuch waren bei der C'-Titration in Gegenwart der 20%igen Milzextrakte von infizierten Mäusen vom 6. Tag p.i. ab größere Mengen erforderlich, um eine 50%ige Hämolyse zu erzeugen als vom 1. bis 5. Tag. Die Kurve erreichte ihren Höhepunkt am 9. und 10. Tag und schien bis zum 14. und 21. Tag kontinuierlich abzufallen, jedoch lag der am 24. Tag gemessene Wert noch beträchtlich über der Norm. Im 4. Versuch (Abb. 6) war der Komplementverbrauch durch Milzextrakt am 8., 14. und 21. Tag wesentlich höher als bei den Extrakten von Mäusen, die 3-72 Stunden p.i. getötet wurden.

Überraschenderweise war im 3. Versuch erhöhter C'-Verbrauch nur nachweisbar bei Verwendung von C' eigener Produktion (s. "Material und Methoden"), nicht dagegen bei konserviertem C' der Behringwerke.

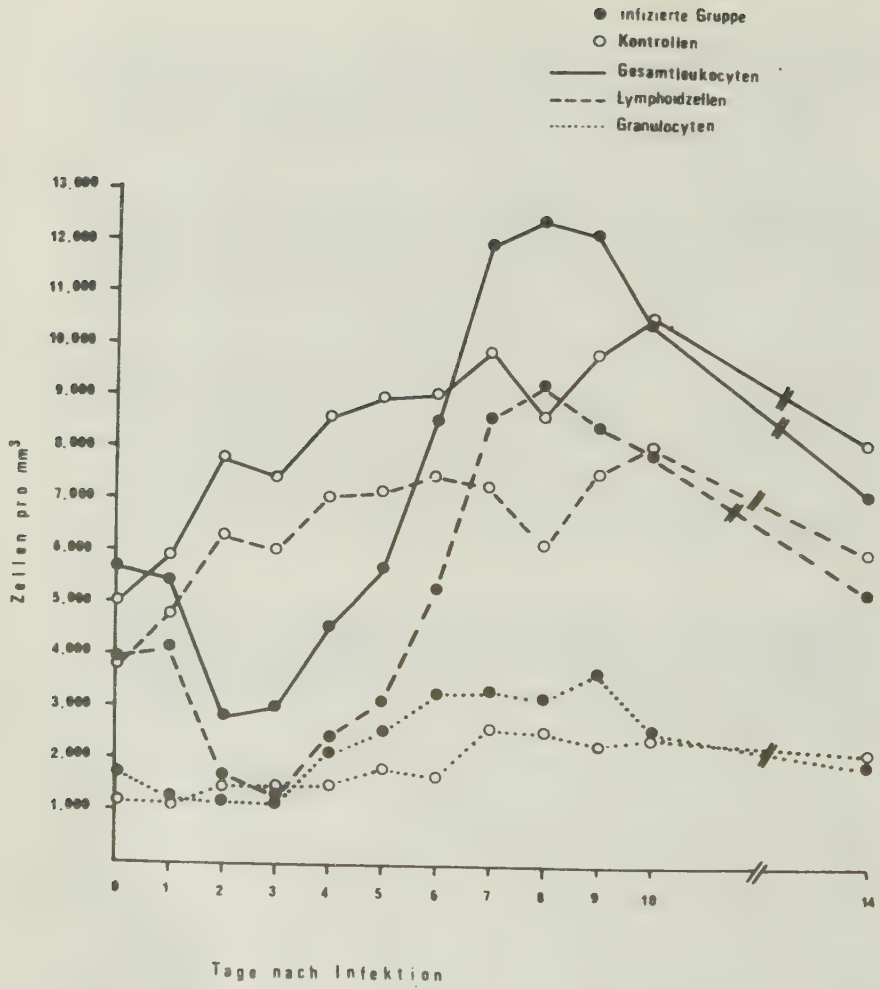


Abb.:1 Weißes Blutbild bei infizierten bzw. normalen Mäusen
1. versuch,

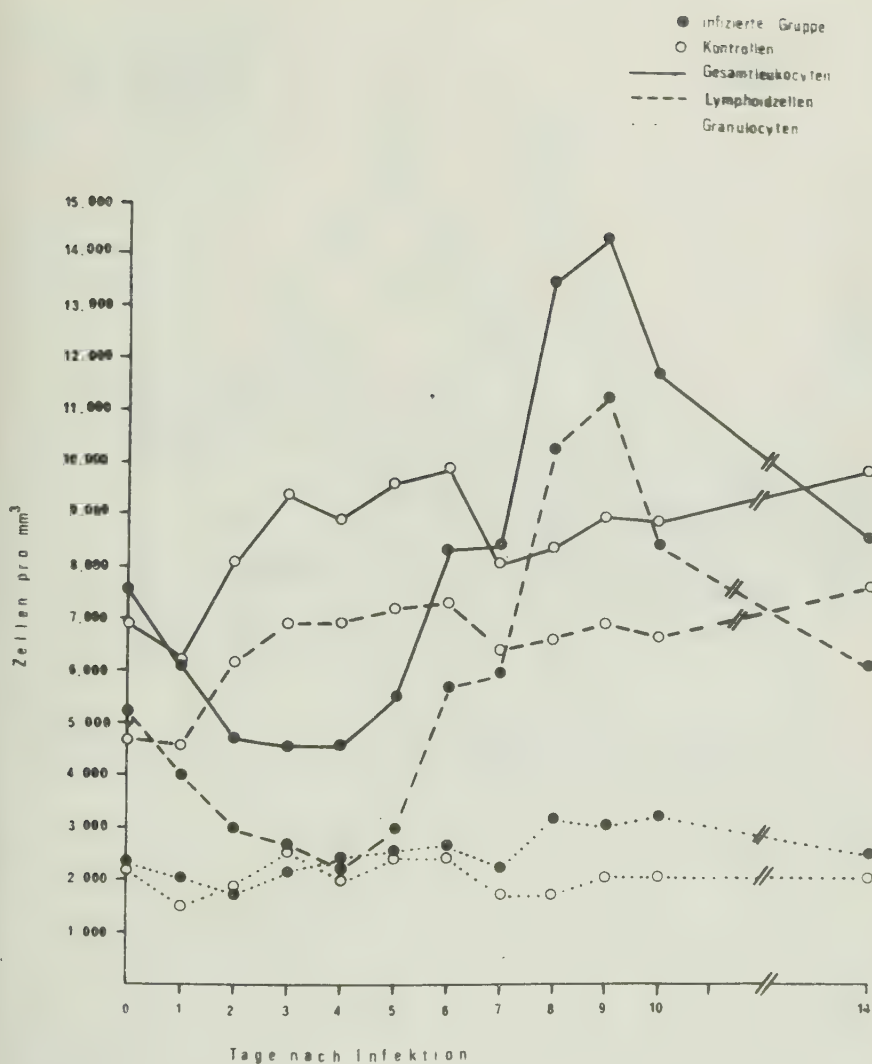


Abb. 2 Weißes Blutbild bei infizierten bzw. normalen Mäusen (2. Versuch,

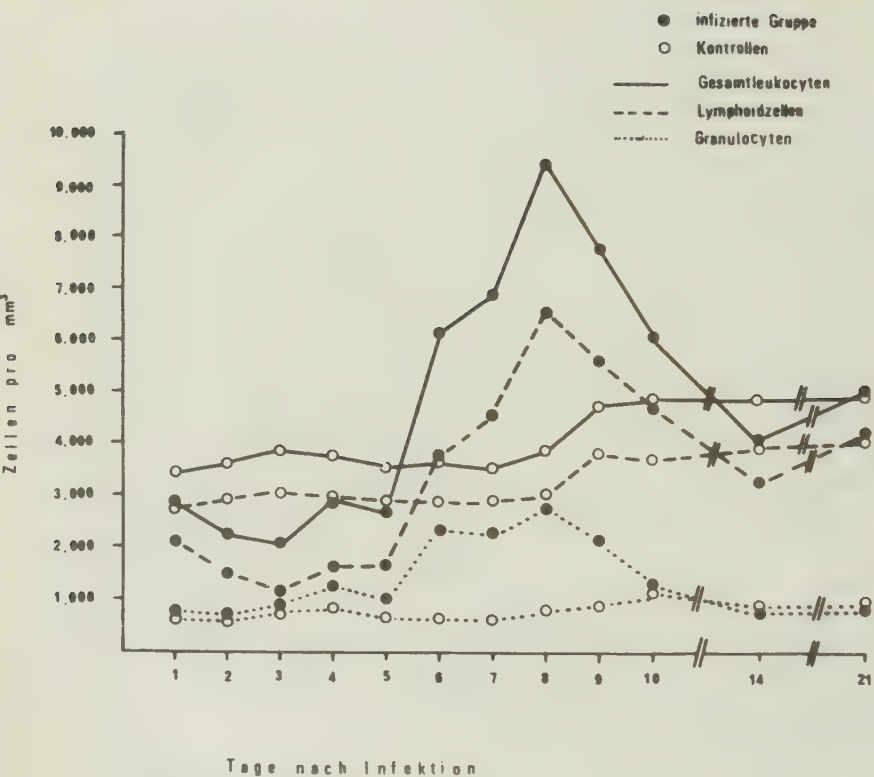


Abb. 3. Leukocytenbild bei infizierten und Kontrollen (5. Versuch)

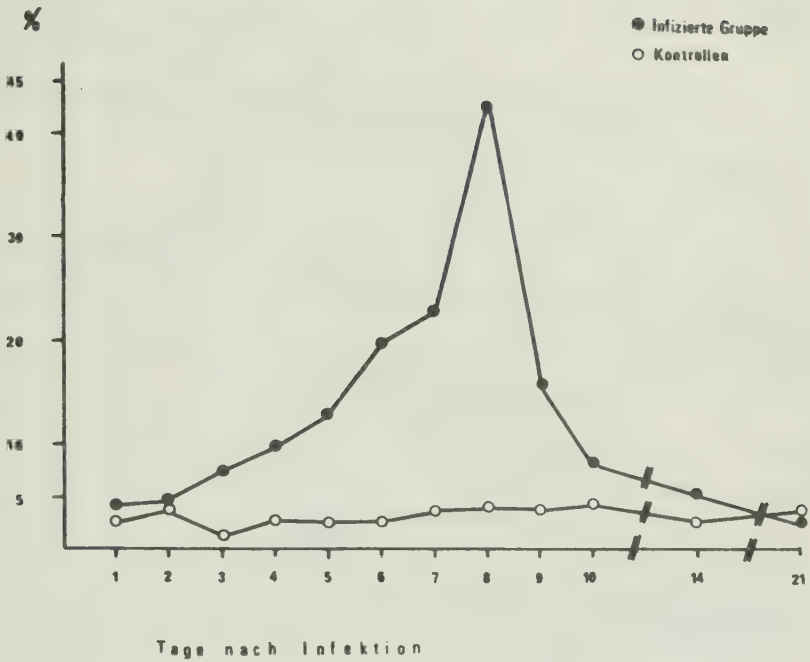


Abb.. 4 verhältnis von lymphblasten zu gesamtlymphocyten in %
bei infizierten und normalen mäusen (3. versuch,

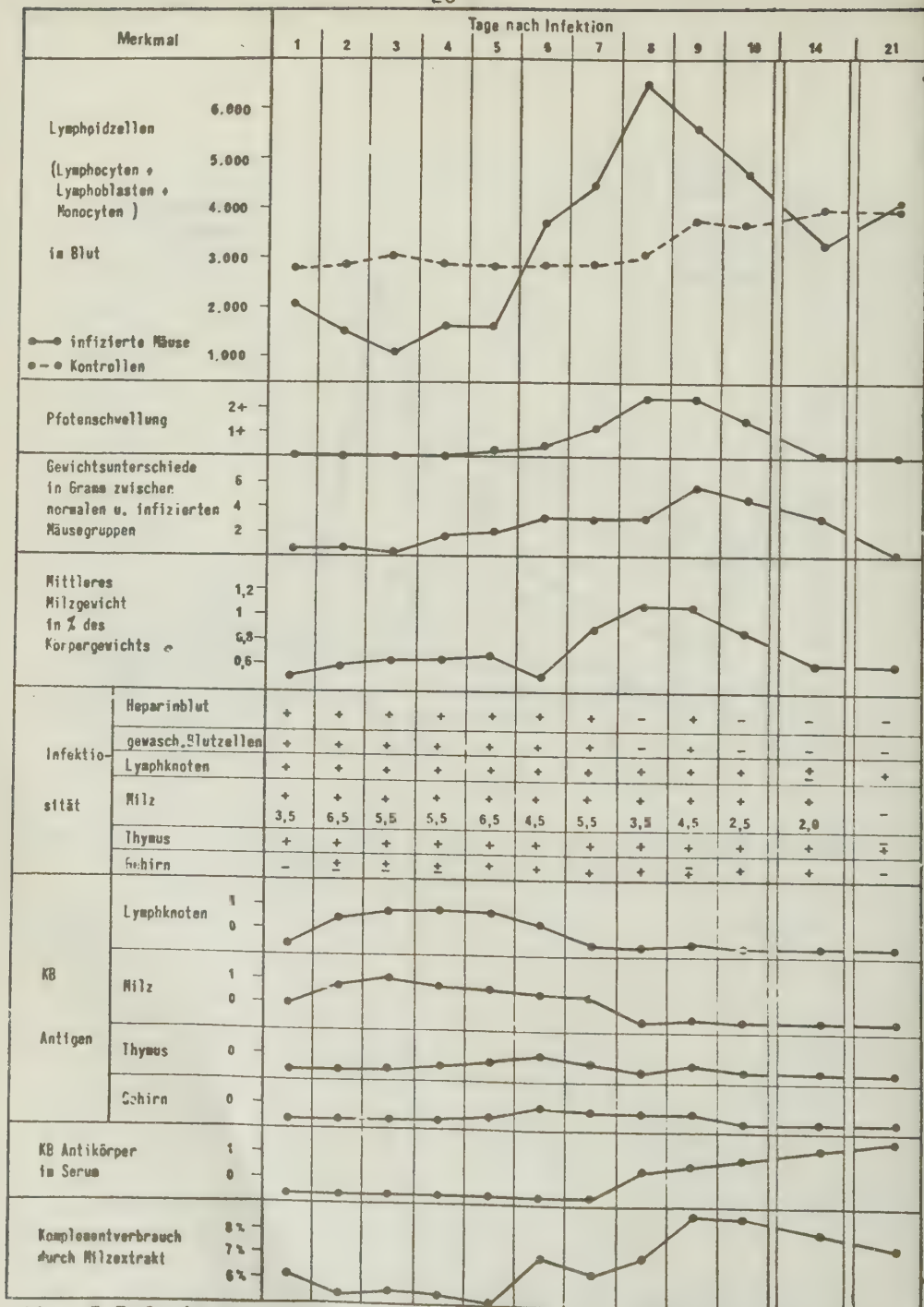


Abb.: 5 Befunde bei infizierten Mäusegruppen zu verschiedenen Zeiten nach kombinierter intraperitonealer und intraplantarer Injektion (3. Versuch)

Anmerkung und Zeichenerklärung zu Abb. 5

Blutbild: Die am Kopf der Abbildung wiedergegebenen Kurven sind der Abb. 3 entnommen.

Pfotenschwellung: Verzeichnet ist die mittlere Stärke der Pfotenschwellung bei Einzelmäusen (je nach Intensität mit 1+ bis 4+ bewertet) bei Mäusegruppen von je 8 Tieren.

Infektiositätsteste: + = sämtliche 3 Testmäuse erkrankten typisch

± = 2 von 3 Mäusen erkrankten; die dritte erkrankte nicht und erwarb keine Immunität gegen eine nachfolgende Testinfektion.

$\overline{+}$ = 1 von 3 Mäusen erkrankte; die übrigen Tiere erkrankten nicht und wurden nicht immun.

- = keine Maus erkrankte oder erwarb cerebrale Immunität.

Die für Milzextrakte angegebenen Titerwerte sind die Zehnerlogarithmen der ID_{50} /ml der 20%igen Extrakte.

Nachweis von KB-Antigen: Angegeben sind die negativen log der Organextraktverdünnungen, die theoretisch 50%ige Hämolyse erlaubt hätten.

Nachweis von KB-Antikörpern Die Serumtiter sind angegeben als negative log der Serumverdünnungen, die theoretisch 50%ige Hämolyse erlaubt hätten.

Komplementverbrauch durch Milzextrakte: Verzeichnet sind die Komplementverdünnungen in %, die bei Komplementtitration in Gegenwart von Antigen (20%iger Milzextrakt) theoretisch 50%ige Hämolyse bewirkt hätten.

Merkmal			Zeit nach Infektion							
			3 Std.	6 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	8 Tage	14 Tage	21 Tage
Weisses Blutbild	Gesamtleukocyten		2,850	2,970	2,800	2,530	2,090	16,390	5,170	4,400
	Lymphocyten		2,138	2,495	2,156	1,670	982	9,670	4,188	3,696
	Lymphoblasten plus Monocyten		57	30	28	25	42	1,967	310	88
	Granulocyten		655	445	616	835	1,066	4,753	672	616
Schwellung der injizierten Hinterpfote			-	-	-	-	-	+	-	-
Mittlere Organ- gewichte (in % des Körper- gewichts)	infizierte Mäuse	Lymphknoten	0,49	0,43	0,45	0,41	0,41	0,89	0,47	0,45
		Milz	0,66	0,72	0,59	0,66	0,64	1,32	0,76	0,56
		Thymus	0,66	0,62	0,58	0,60	0,68	0,45	0,42	0,46
		Leber	4,16	3,82	5,31	5,08	5,20	5,24	6,20	5,46
	normale Mäuse	Lymphknoten							0,54	
		Milz							0,52	
		Thymus							0,45	
		Leber							5,38	
Infektio- sität	Herzblut		1/3	0/3	1/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
	Lymphknoten		1/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3
	Milz		2/3 2,0	3/3 2,0	3/3 5,1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Thymus		0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Leber		1/3	0/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
KB Antigen	Lymphknoten		-	-	> 1:1	1:3	1:20	-	-	-
	Milz		-	-	1:1	1:8	1:16	-	-	-
	Thymus		-	-	> 1:1	1:2	1:1	-	-	-
	Leber		-	-	-	-	-	-	-	-
KB Antikörper im Serum			-	-	-	-	-	> 1:5	1:28	1:89
Komplementverbrauch durch Milzextrakt			- 3,7%	- 3,7%	- 4,5%	- 4,5%	- 4,0%	- 6,0%	- 6,0%	- 6,7%

Abb.: 6 befunde bei infizierten Mäusegruppen zu verschiedenen Zeiten nach kombinierter intraperitonealer und intraplantarer Injektion (4. Versuch)

Anmerkung: bei Infektiositätstesten zeigt der Zähler die Zahl der erkrankten bzw. immunisierten, der Nenner die Zahl der injizierten Mäuse an. Die angegebenen KB-titer sind die Antigen- bzw. Serumverdünnungen, die theoretisch 50%ige Hämolyse erlaubt hätten.

Tabelle 1

weißes Blutbild bei neonatal infizierten (immuntoleranten) und normalen Mäusen

Immuntolerante Mäuse					Normale Mäuse				
	Gesamt-leukocyten	Lymphocyten	Lymphobl. Monocyten	Granulocyten	Nr.	Gesamt-leukocyten	Lymphocyten	Lymphobl. Monocyten	Granulocyt.
1	9.200	7.544	184	1.272	1	10.700	8.600	420	1.680
2	7.300	5.694	219	1.387	2	11.300	9.605	113	1.582
3	7.900	5.925	237	1.738	3	8.900	6.675	356	1.869
4	6.700	4.958	67	1.675	4	9.800	7.546	196	2.058
5	8.000	6.720	160	1.120	5	10.400	8.528	416	1.456
6	7.900	6.478	158	1.264	6	9.700	8.148	194	1.358
7	10.500	9.030	0	1.470	7	9.250	6.752	272	2.220
8	11.000	8.800	330	1.870	8	8.900	6.853	178	1.869
9	10.900	9.810	109	981	9	8.400	6.132	252	2.016
10	11.400	10.146	114	1.140	10	9.300	7.161	279	1.860
11	7.400	5.846	222	1.332	11	9.900	7.920	198	1.782
12	7.700	6.160	144	1.396	12	8.650	7.180	173	1.297
13	7.000	5.670	140	1.190	13	8.200	6.232	328	1.640
14	7.100	5.254	142	1.704	14	7.900	6.688	305	1.817
15	9.500	7.505	95	1.900	15	7.600	6.004	304	1.292
16	9.300	7.254	186	1.860	16	8.800	6.864	264	1.672
17	10.000	7.000	300	2.700	17	8.600	6.536	344	1.720
18	9.100	6.522	182	2.366	18	9.250	7.308	277	1.665
19	9.300	7.161	279	1.860	19	9.000	7.200	180	1.620
20	11.000	6.270	110	4.620	20	8.400	6.972	0	1.428
MW*	8.920	7.000	160	1.764	MW*	9.147	7.169	257	1.695

* Mittelwerte

Tabelle 2

Befunde bei Einzelmäusen am 8. tag p.i.

Infizierte Mäuse													Kontrollen
Nr.	Gew.- zunahme in gr.	Weisses Blutbild				Pforten- schwel- lung	Perito- nitis	Milzgew. in % des K.gew.	Virus im Blut	KB Anti- körper	KB Anti- gen in der Milz	Nr.	Gew. zunah- me in
		Gesamt- leuko.	Ly	LyBl +Mo	Gran.								
1	5,1	20.500	12.095	3.485	4.920	2 +	-	1,2	1/2	-	-	1	9,1
2	7,7	11.500	5.175	1.280	4.025	2 +	-	1,6	0/2	-	-	2	8,1
3	0,2	28.500	12.255	4.275	11.970	1,5+	-	1,0	1/2	Spur	-	3	9,1
4	5,9	21.000	8.400	4.410	8.290	1,5+	-	1,6	2/2	-	-	4	8,1
5	5,8	16.200	7.052	2.460	6.688	2,5+	-	1,3	0/2	-	-	5	9,1
6	4,7	9.600	4.800	1.920	2.880	1 +	-	1,1	0/2	-	-	6	9,4
7	4,7	12.600	8.170	902	3.528	2 +	-	1,4	1/2	Spur	-	7	8,0
8	6,7	16.000	3.960	1.440	5.600	1 +	-	1,7	1/2	-	-	8	8,7
9	4,6	36.000	11.880	7.920	16.200	3 +	-	1,9	2/2	Spur	-	9	8,4
10	6,4	17.500	11.200	2.450	3.850	2,5+	-	1,2	0/2	-	-	10	9,6
11	3,9	11.000	5.390	990	4.620	0,5+	-	0,6	2/2	-	-	11	8,3
12	5,2	20.400	8.160	2.448	9.792	1 +	-	0,9	1/1	-	-	12	7,6
13	4,9	18.000	9.540	2.340	6.120	2,5+	-	1,6	2/2	Spur	-	13	10,0
14	5,8	16.800	6.720	2.688	7.392	0,5+	3 +	1,0	2/2	-	1:1,5	14	9,7
15	6,4	19.000	7.960	2.280	8.740	1,5+	-	1,2	0/2	Spur	-	15	9,8
16	6,6	18.200	8.008	1.820	8.372	1,5+	-	1,2	0/2	3,5+	-	16	9,2
17	7,6	19.100	10.314	2.292	6.494	2 +	2+	1,0	0/2	-	-		
18	5,4	24.600	15.252	2.214	7.134	1,5+	-	0,9	0/2	Spur	-		
Mittel- werte	5,4	18.680	8.960	2.640	7.080	1,7+		1,25	bei 8 M. virusfrei				9,

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Das weiße Blutbild bei der LCM nicht toleranter Mäuse ist nach den vorliegenden Untersuchungen gekennzeichnet durch eine Leukopenie und eine darauffolgende Leukocytose. Dies erinnert an Befunde bei anderen tierischen Viruskrankheiten, z.B. bei der infektiösen Anämie der Ratte (25) und der Schweinepest (4), bei denen ebenfalls eine Lymphopenie mit anschließender Lymphocytose beschrieben worden sind. Die Lymphopenie tritt bei Mäusen vom 2. bis 4. Tag nach kombinierter ip und ipl Infektion in Erscheinung. Die etwa am 5. Tag beginnende Zunahme der Leukocyten, insbesondere der lymphoiden Zellen, hat ihren Höhepunkt gewöhnlich um den 8. Tag. An der Leukocytose sind außer typischen Lymphocyten auch große mononukleäre Zellen beteiligt, die als Lymphoblasten angesprochen wurden und von den Monocyten nicht mit Sicherheit unterscheidenden werden konnten. Die Zahl dieser Lymphoblasten war am 8. Tag am höchsten. Bei dem in Abb. 3 und 4 dargestellten Versuch betrug um diese Zeit der Anteil der Lymphoblasten an den lymphoiden Zellen etwa 45%.

Im Gegensatz zu den Lymphocyten ließen die Granulocyten im Frühstadium keinen Abfall erkennen. Dagegen wurde in jedem Versuch (s. Abb. 1-3 und 6) eine nicht sehr hochgradige, aber dennoch deutlich ausgeprägte Granulocytose ohne wesentliche Kernlinksverschiebung festgestellt. Die gleichartigen Ergebnisse verschiedener Versuche zeigen, daß diese Befunde reproduzierbar sind.

Die höheren Leukocytenwerte bei Schwanzblut im Vergleich mit Herzblut bestätigten frühere Befunde von KLIENEGER (18). Eine befriedigende Erklärung für diese Diskrepanz gibt es noch nicht. Die Zunahme der absoluten Leukocytenzahlen mit zunehmendem Alter wurde früher schon von KUNZE (19) beobachtet.

Da es nach den in Abb. 6 verzeichneten Titrationsergebnissen bei infizierten Mäusen zu einer sehr raschen Virusvermehrung in der Milz und, um nach Inkubationsfristen bei Testmäusen zu urteilen, vermutlich auch in den Lymphknoten kommt, liegt der Gedanke nahe, daß die regelmäßig auftretende Lymphopenie auf einer direkten Viruswirkung auf den lymphopoetischen Apparat beruht. Beweisbar ist dies jedoch noch nicht (s. Abschnitt "Schrifttum"). Abgesehen von offensichtlich zerquetschten Zellen wurden in Blutaussstrichen keine nekrotischen Lymphocyten gesehen, die auf eine zerstörende Wirkung des Virus auf zirkulierende Leukocyten hätten schließen lassen.

Die Art des die nachfolgende Leukocytose verursachenden Stimulans ist ebenfalls noch unbekannt. Es ist nicht erwiesen, daß es sich hierbei um das Virus selbst handelt. Die Tatsache, daß sowohl die lymphoiden Zellen als auch die Granulocyten etwa vom 5. Tag p.i. ab zunehmen, läßt vermuten, daß der Anreiz zur Zellneubildung auf eine primitive Zellart im retikulären System (Retikulocyten? Stammzellen?) gerichtet ist. Da die Vermehrung der lymphoiden Zellen und der Granulocyten ziemlich parallel erfolgte, scheint es sich im vorliegenden Fall nicht um eine kompensatorische Granulocytose zu handeln.

Wie die Übersichtsabbildungen 5 und 6 zeigen, fiel mit der Lymphopenie außer der raschen Vermehrung des infektiösen Virus eine Zunahme des KB-Antigens in den Lymphknoten und in der Milz zeitlich zusammen. Um diese Zeit wurden weder eine Schwellung der injizierten Hinterpfote oder sonstige Krankheitserscheinungen noch eine deutliche Hemmung des Körperwachstums festgestellt. Auch das Milzgewicht war noch nicht wesentlich verändert. Im Blut waren noch keine KB-Antikörper nachweisbar und der C'-Verbrauch durch Milzextrakte war noch nicht erhöht.

Im Stadium der Leukocytose dagegen waren neben einer Hemmung des Wachstums eine Schwellung der injizierten Hinterpfote und

bei manchen Tieren auch Anzeichen einer Pleuro-Peritonitis zu beobachten. Bei Mäusen, die am 8. Tag p.i. getötet wurden, konnte man fast regelmäßig eine Schwellung der Lymphknoten und der Milz feststellen, die offenbar mit der Zunahme der Lymphoidzellen im Blut in Zusammenhang stand. Erst am 8. Tag wurden im Serum geringe Mengen von KB-Antikörpern nachgewiesen, deren Titer sich bis zum Maximalwert am 21. Tag linear erhöhte. Der Komplementverbrauch durch Milzextrakte war vom 6. Tag ab vermehrt, was auf die Anwesenheit von Antigen-Antikörperkomplexen in der Milz hinweist. Der Nachweis von KB-Antigen in Lymphknoten und Milz mißlang am 7. bzw. 8. Tag und auch die Infektiosität des Blutes war um diese Zeit stark abgesunken oder gleich Null.

Diese Befunde lassen sich mit der eingangs erwähnten Theorie von HOTCHIN (10) in Einklang bringen, nach der die Krankheitserscheinungen und die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei LCM-infizierten, nicht toleranten Mäusen auf einem der Abwehrreaktion gegenüber fremdem Gewebe vergleichbaren immunologischen Konflikt beruhen. Man könnte sich die dabei ablaufenden Vorgänge wie folgt vorstellen: Bei den im Stadium der Lymphocytose neugebildeten Zellen handelt es sich höchstwahrscheinlich um sensibilisierte, sog. "Killer"-Lymphocyten, die selbst virusfrei sind, gegen infizierte Zellen reagieren, hierdurch Krankheitserscheinungen verursachen, aber gleichzeitig infektiöses Virus und Virusantigen eliminieren. Eine Antigen-Antikörperreaktion ist hierbei vermutlich von untergeordneter Bedeutung (13). In dem in Abb. 5 wiedergegebenen Versuch stieg die Zahl der lymphoiden Zellen bei infizierten Mäusegruppen bereits vor dem Erscheinen von KB-Antikörpern im Serum beträchtlich an. Von den in Tabelle 2 aufgeführten 18 infizierten Einzelmäusen hatten am 8. Tag p.i. nur 7 Tiere Spuren von KB-Antikörpern gebildet, während alle Mäuse hohe Lymphocytenzahlen aufwiesen. Auf neutralisierende Antikörper wurde nicht untersucht, da ihr Nachweis zu diesem Zeitpunkt

höchstwahrscheinlich nicht gelungen wäre (17). noch nicht definierbar ist die Antikörperart, die bei der spontanen, vermutlich durch Antigen-Antikörperkomplexe bewirkten Komplementbindung durch Milzextrakte (in den Abb. 5 und 6 als "Komplementverbrauch" bezeichnet) vom 6. Tage p.i. ab im Spiele ist. Beim derzeitigen Stand der Forschung (13) ist es jedoch wenig wahrscheinlich, daß sie eine wesentliche Rolle spielen.

Bei immuntoleranten Mäusen kommt es nicht zu einem solchen Konflikt, obwohl sie große Virusmengen im Körper beherbergen. ihr Blutbild entspricht daher im wesentlichen dem normaler Mäuse (s. Tabelle 1).

Die Versuche haben gezeigt, daß bei LCM-infizierten Mäusen das weiße Blutbild ein Indikator für die im Körper sich abspielenden immunbiologischen Vorgänge ist. Noch nicht geklärt ist jedoch die Frage, ob es sich bei den im Stadium der Lymphocytose im Blute erscheinenden, offenbar virusfreien neuen Zellen um T-Zellen oder um B-Zellen oder um ein Gemisch beider Zelltypen handelt.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Das weiße Blutbild wurde bei neonatal infizierten Mäusen mit Immuntoleranz sowie bei 3-5 Wochen alten nicht toleranten Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach kombinierter intraperitonealer und intraplantarer Infektion untersucht. Die hämatologischen Befunde wurden in Beziehung gebracht zu den Krankheitserscheinungen, den pathologisch-anatomischen Veränderungen, der Virusvermehrung, dem Gehalt bestimmter Organe an komplementbindendem Antigen, dem Komplementbindungstiter des Serums und der spontanen Komplementbindung durch Milzextrakte.

Bei immuntoleranten Mäusen war das weiße Blutbild im Vergleich zu normalen Mäusen im wesentlichen unverändert. Dagegen zeigten nicht tolerante Tiere vom 2. bis 4. Tag p.i. eine Lymphopenie. Ihr folgte eine am 5. oder 6. Tag beginnende, am 8. oder 9. Tag ihren Höhepunkt erreichende starke Vermehrung der lymphoiden Zellen. An dieser waren in erheblichem Maße Lymphoblasten beteiligt, die sich an den folgenden Tagen rasch in typische Lymphocyten umwandelten. Parallel mit der Lymphocytose lief eine weniger stark ausgeprägte Granulocytose ohne markante Kernlinksverschiebung.

Mit der Lymphopenie fielen eine rasche Virusvermehrung in der Milz sowie eine Anreicherung von komplementbindendem Antigen in lymphatischen Organen zeitlich zusammen.

Krankheitserscheinungen (Pfotenschwellung, mitunter Fleuro-Peritonitis, Hemmung des Körperwachstums) und die Organveränderungen (Lymphknoten- und Milzschwellung) traten erst im Stadium der Leukocytose auf. Gleichzeitig hiermit verschwanden das Virus aus dem Blut und das komplementbindende Antigen aus den lymphatischen Organen.

Komplementbindende Antikörper waren im Blut frühestens am 8. Tag in geringen Mengen nachweisbar und erreichten erst etwa 3 Wochen p.i. ihr Maximum. Dagegen wurde spontane Komplementbindung durch Milzextrakte, die auf die Anwesenheit von Antigen-Antikörperkomplexen schließen läßt, bereits am 6. Tag festgestellt.

Die Befunde sind vereinbar mit der Theorie von HOTCHIN (10), nach der die LCM der Mäuse eine Autoimmunkrankheit darstellt.

S U M M A R Y

Blood leucocyte counts were made on mice showing immunological tolerance following neonatal infection with LCM virus as well as on 3 to 5 week-old mice examined different periods of time after combined intraperitoneal and foot pad infection. The hematological findings were correlated with the symptomatology, the gross pathological changes, the multiplication of the virus, the presence and titer of complementfixing (CF) antigen in various organs, the appearance of CF antibody in the serum and the ability of spleen extracts to fix complement spontaneously.

White cell counts were essentially normal in tolerant animals. Non-tolerant mice showed leucopenia from days 2 to 4 postinoculation. It was followed by a marked increase of lymphoid cells starting on days 5 or 6 and reaching a maximum on days 8 or 9. At this stage, blast cells were very frequent among the lymphocytes on the following days. Lymphocytosis was paralleled by a less marked granulocytosis in which juvenile forms played only a minor part.

Leucopenia coincided with rapid viral multiplication in the spleen and with accumulation of CF antigen in lymphatic organs.

Signs of disease such as retardation of growth, swelling of the inoculated foot pad and, occasionally, peritonitis and/or pleuritis were recorded only during the second stage characterized by leucocytosis. There was swelling of the spleen and lymph nodes. Infectious virus disappeared rapidly from the blood and CF antigen from the organs.

Minute amounts of CF antibody were detected in the serum on day 8. The CF titer showed a linear increase thereafter and reached a maximum by day 21. Spontaneous complement fixation by spleen extracts, suggestive of the presence of antigen-antibody complexes, was first noted on day 6.

The results are in agreement with HOTCHIN's theory (10) according to which LCM in mice represents an autoimmune disease.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Abelson, H.T.
Smith, G.H.
Hoffmann, H.A.
Rowe, W.P.
"Use of enzymelabeled antibody for electron microscope localization of lymphocytic choriomeningitis virus antigens in infected cell cultures." J. nat. Cancer Inst. 42; 497-515, 1969
2. Armstrong, C.
Lillie, R.D.
"Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic." Publ. Hlth Rep., Wash. 49; 1019-1027, 1934
3. Burnet, F.M.
Fenner, F.
"The production of antibodies." Monograph of the Walter and Eliza Hall Institute. 2nd ed., 142pp., 1949 (Macmillan and Co. Ltd., Melbourne).
4. Fuchs, F.
"Schweinepest." in: Hdb. d. Virusinfektionen bei Tieren, Herausg. H. Röhrer, III/1, 15-250, VEB G. Fischer, Jena, 1968
5. Gross, L.
"Pathogenic properties and "vertical" transmission of the mouse leukemia agent." Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. N. Y., 78; 342, 1953
6. Haas, V.H.
"Sparing effect of a methopterin and guanazolo in mice with the virus of lymphocytic choriomeningitis virus." Virology 2; 511-516, 1956
7. Hanaoka, M.
Suzuki, S.
Notchin, J.
"Distruaction of thymus dependent lymphocytes by lymphocytic choriomenin-gitis virus." Science 163; 1216-1219, 1969
8. Hirsch, M.S.
Murphy, F.A.
Russe, H.F.
Hicklin, M.D.
"Effects of antithymocyte serum on lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus infection in mice." Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 125; 980-983, 1967

9. Hotchin, J.E. "The role of immunological tolerance in neonatal infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus." Quart. Rev. Pediat. 16; 97-101, 1961
10. Hotchin, J. "The biology of lymphocytic choriomeningitis infection: Virus induced immune disease." Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 27; 497-499, 1962
11. Hotchin, J. "The food pad reaction of mice to lymphocytic choriomeningitis virus." Virology, 17; 214-215, 1962
12. Hotchin, J. "A concept of persistent virus infection." Proc. of the 3rd int. Symp. on medical and applied virology: Viruses affecting man and animals, 1970
13. Hotchin, J. "Persistent and Slow Virus Infections." Monographs in Virology, 111, S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sidney, 1971
14. Hotchin, J.
Benson, L.M. "Mouse-weight measurements as an index of virus disease." N. Y. State Dep. Health, Ann. Rep. Div. Lab. Res., pp.42-43, 1961
15. Hotchin, J.
Weigand, H. "Relationship between age at inoculation and outcome of infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus." N. Y. State Dep. Health, Ann. Rep. Div. Lab. Res., p. 21, 1959
16. Hotchin, J.
Weigand, H. "The effects of pretreatment with X-rays on the pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis in mice. I. Host survival, virus multiplication and leucocytosis." J. Immunol. 87; 675-681, 1961
17. Hotchin, J.
Benson, L.
Sikora, E. "Detection of neutralizing antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in mice." J. Immunol. 102; 1128-1135, 1969

18. Klieneberger, C. "Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere"
2., Leipzig 1927
19. Kunze, H. *Zeitschrift für Klinische Hämatalogie*, 72, 4.; 1954
(zit. nach Schermer)
20. Lehmann-Grube, F. "Lymphocytic Choriomeningitis virus"
Virology Monographs, 10; 1971
Springer; Wien New York
21. Lillie, R.D.
Armstrong, C. "Pathology of lymphocytic choriomeningitis in mice."
Arch. Path. 40; 141-152, 1945
22. Lundstedt, C.
Volkert, M. "Studies on immunological tolerance to LCM virus. 8. Induction of tolerance to the virus in adult mice treated with antilymphocytic serum."
Acta path. microbiol. scand. 71; 471- 480, 1967
23. Meythaler, F. "Infektiöse Mononukleose"
in: "Virus und Rickettsieninfektionen des Menschen"; Herausg. R. Haas, O. Vivell, 913-934; J. F. Lehmanns, München, 1965
24. Reed, L.H.
Muench, H. "A simple method of estimating fifty per cent endpoints"
Amer. J. Hyg., 27, 493, 1938
25. Richters, C.E. "Ansteckende Blutarmut der Einhufer"
in: "Handbuch der Viruskrankheiten"
Herausg. Gildemeister, Haagen und Waldmann; Gustav Fischer, Jena, 1, 618, 1939
26. Rowe, W.P. "Protective effect of pre-irradiation on lymphocytic choriomeningitis infection in mice."
Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 92, 194-198, 1956
27. Rowe, W.P.
Black, P.H.
Levey, R.H. "Protective effect of neonatal thymectomy on mouse LCM infection."
Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 114, 248-251, 1963
28. Schermer, S. "Blutmorphologie der Laboratoriumstiere."
2. Aufl., Johann Ambrosius Barth, Leipzig, S. 65, 68, 1958

29. Sikora, E. "Protective effect of neonatal thymectomy on lymphocytic choriomeningitis virus disease in mice." N. Y. State Dep. Health, Ann. Rep. Div. Lab. Res., pp. 43-44, 1963
30. Traub, E. "The epidemiology of lymphocytic choriomeningitis in white mice." J. exp. Med. 64, 183-200, 1936
31. Traub, E. "Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity." J. exp. Med. 63, 847-861, 1936
32. Traub, E. "An epidemic in a mouse colony due to the acute lymphocytic choriomeningitis." J. exp. Med. 63, 533-546, 1936
33. Traub, E. "Factors influencing the persistence of choriomeningitis in the blood of mice after clinical recovery." J. exp. Med. 68, 229-250, 1938
34. Traub, E. "Epidemiology of lymphocytic choriomeningitis in a mouse stock observed for four years." J. exp. Med. 69, 801-817, 1939
35. Traub, E. "Über die immunologische Toleranz bei der lymphocytären Choriomeningitis der Mäuse." Zbl. Bakt. 177, 472-487, 1960
36. Traub, E. "Über die natürliche Übertragungsweise des Virus der lymphocytären Choriomeningitis (LCM) bei Mäusen und ihre Parallelen zum Übertragungsmodus gewisser muriner Krebsviren." Zbl. Bakt. 177, 453-471, 1960
37. Traub, E. "Studies on the mechanism of immunity in murine LCM." Arch. ges. Virusforsch. 14, 65-86, 1963
38. Traub, E.
Kesting, F. "Further observations on the behaviour of the cells in murine LCM." Arch. ges. Virusforsch. 13, 452-469, 1963

39. Traub, E.
Bechmann, G.

"Indirekte Komplementbindung mit Mäuseseren nach Schutzimpfung mit monovalenter Maul- und Klauenseuche-Vaccine."

Zentralblatt für Veterinärmedizin,
B, 16, 240-257, 1969

40. Volkert, M.

"Studies on immunologic tolerance to LCM virus."

in: Prospectives in virology, vol IV,
chapt. 16, pp. 269-282, 1965
Harper and Row, New York.

LEBENS LAUF

Am 1. Februar 1948 wurde ich, Eberhard Schüle, als Sohn des Alfred Schüle und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Popp, in Heilbronn geboren.

Nach 4 Volksschulklassen in Bad Friedrichshall trat ich 1958 in das Albert - Schweitzer - Gymnasium in Neckarsulm ein und legte dort 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Dieses schloß ich 1971 mit dem Staatsexamen ab.

Herrn Professor Dr. Dr.h.c. A. Mayr danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. Dr.h.c. E. Traub und Fräulein F. Kesting danke ich an dieser Stelle für die jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung.

Für die finanzielle und technische Unterstützung bin ich dem Institut für vergleichende Tropenmedizin und Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Munz zu Dank verpflichtet.

